

図 5 修飾ヘモグロビン投与による血管収縮の機序

粒径の小さい Hb は内皮細胞由来の弛緩因子(NO)が平滑筋に到達する前に捕捉しやすく、これが血管収縮につながるものと考えられる。他方、Hb 小胞体では血管内にとどまるため、NO 捕捉反応は抑制され、血管収縮は生じしない。

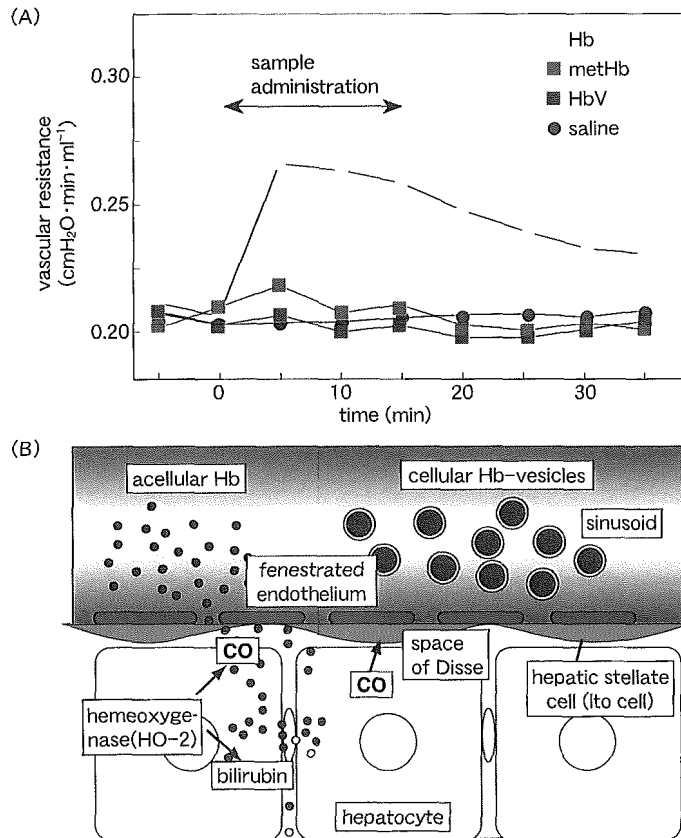


図 6 肝の微小循環動態とヘモグロビン代謝

A : 精製 Hb 溶液で摘出肝を灌流すると灌流圧が上昇するが、Hb 小胞体と metHb の場合は灌流圧は上昇しない。

B : A の説明。Hb 分子は類洞血管の孔(fenestration)を通して Disse 腔に容易に拡散し、heme は肝実質細胞の hemeoxygenase-2 により代謝され、ビリルビンと CO を排泄する。本来 CO は類洞血管を覆う Ito 細胞に血管弛緩因子として作用するが、Disse 腔で Hb に捕捉され、弛緩作用低下のため灌流圧増大につながると理解される。他方、Hb 小胞体は篩孔より大きいので Disse 腔に入らず、CO を結合しないため、肝の微小循環はほとんど変わらない。また、metHb は Disse 腔に拡散するが、CO を結合しないため変化しない。この結果は、肝における CO の役割解明に重要な発見となった。

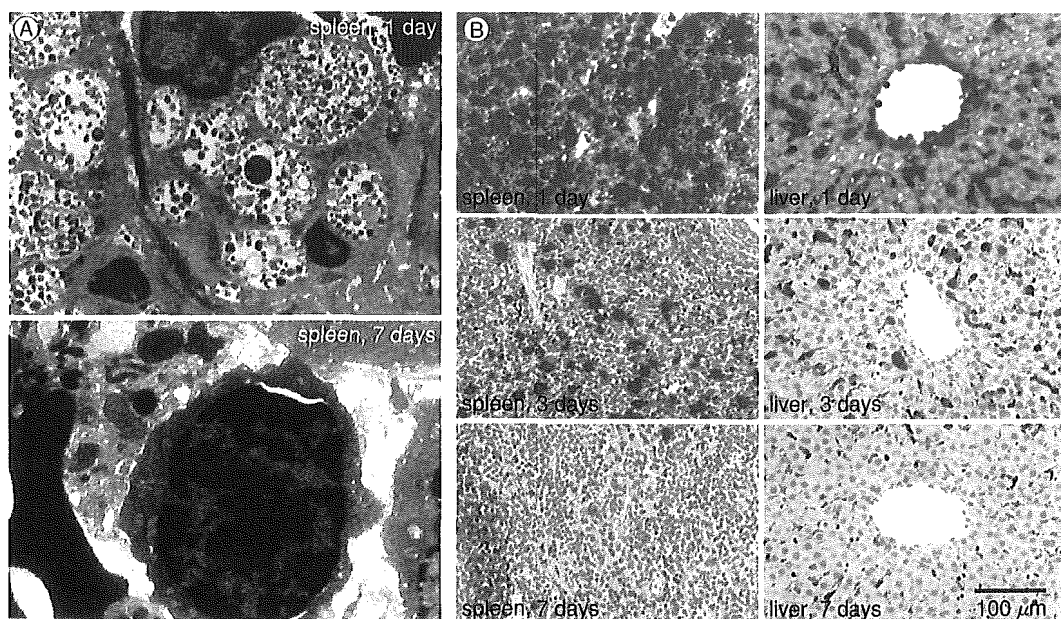


図 7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

A : Hb 小胞体投与 1 日後のラット脾マクロファージの透過型電子顕微鏡写真. 食胞(phagosome)中に Hb 小胞体の粒子が多数認められる. 7 日後には消失する.

B : Hb 小胞体投与後のラット肝, 脾組織の顕微鏡写真. 抗ヒト Hb 抗体染色による赤染はヒト Hb の存在部位を示す. 投与 1 日後で多量の Hb の存在を認めるが, 7 日後にはほとんど消失し, 蓄積はまったく認めない.

ている. しかし, 赤血球の NO 結合速度( $5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )に比較すると 2 桁もまだ速いことになり, NO 結合速度の違いだけでは説明できない. 現在のところ, 分子状の修飾 Hb は血管内皮細胞層を透過して平滑筋近傍に到達し, 内皮細胞が産生する NO を捕捉し血管弛緩機能を低下させるが, 直径 250 nm の Hb 小胞体では赤血球と同様に平滑筋までは到達できず, 血管内腔にとどまるため, 血管収縮も血圧亢進も起こらないと考えている(図 5).

肝中では肝実質細胞にある hemoxygenase がヘムを分解する. 実はこの際に産生する一酸化炭素(CO)が, 血管弛緩因子として血管内壁の Ito 細胞に作用することがはじめて明確に示された. 末松らは摘出肝灌流中の微小循環動態を検討し(図 6), 類洞血管の孔(穿孔節; fenestration, 孔径約 100 nm)よりも小さい修飾 Hb(7 nm)はこれを容易に通過して Disse 腔に侵入し, 肝実質細胞で代謝され, bilirubin 排泄の亢進と同時に CO を放出するが, CO 親和性の高い血中 Hb に捕捉され, 結果として 20%の血管抵抗増大と同時に, 類洞の不連

続的狭窄と流動停止領域の存在を確認している. 他方, Hb 小胞体では粒径が 250 nm と大きいため, 類洞血管の孔を透過できず肝実質細胞に到達しないので, この現象は生起しない. この間灌流圧は一定値に保たれている<sup>24,25</sup>. この結果は臓器移植の際に Hb 小胞体を灌流液として安全に使用できることも意味しており, 摘出してから移植までの所要時間を延長できるので, 移植臓器をこれまでよりも遠隔地への運搬が可能となる.

### 3. 代謝過程

酸素輸液の投与は必然的に血液の大半を置換するくらいの大量投与もありうることで前提となるので, 成分の体内動態と代謝過程の詳細知見を検討する必要がある. これまでの検討の結果, 投与された Hb 小胞体は最終的には貪食細胞が多く存在する脾, 肝, 骨髄など, いわゆる細網内皮系(RES)に移行することが同位元素( $^{99m}\text{Tc}$ )修飾した Hb 小胞体の体内動態観測から解明され, RES 機能への影響と Hb 小胞体の構成成分の代謝も確認された. 貪食細胞に捕捉された Hb 小胞体が 7 日以内に分解消失し<sup>26</sup>(図 7), また脾臓の重量も

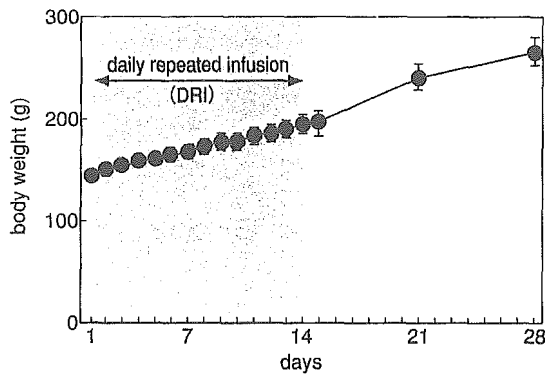


図 8 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験

ラットに Hb 小胞体を 14 日間連続投与する (10 ml/kg/day × 14 days). 期間中, 全例生存する. その体重はほぼ直線的に増加し続けた. ラットの循環血液量は 56 ml/kg なので, 総投与量 (140 ml/kg) はその 2.5 倍に匹敵する.

当初一過性増大を示すが 7 日後には正常値に戻り, 血液生化学検査も異常値を認めないので<sup>27)</sup>, 老化赤血球の代謝経路と同様と考えている. また, 40%の血液を急速交換した後の生存試験(ラット)でも 1 週間後には赤血球量は正常値にまで回復し

ているので, Hb 小胞体の成分が造血に有効利用されていることも考えられ, 現在詳細を検討している.

#### 4. 反復投与試験

新薬の非臨床試験における安全度確認のための項目のひとつに, GMP 基準で製造された試料について齧歯類およびその他を対象とした反復投与試験がある. 予備的にラットに対して Hb 小胞体の反復投与試験(投与量 10 ml/kg/day を 14 日間投与)を実施し, 循環血液量の実に 2.5 倍もの分散液を投与したが, 体重は増加し続け(図 8, 9), 血液生化学的・組織病理学的検討でも顕著な副作用がなく, Hb 小胞体の成分が速やかに代謝されている過程が結果として得られ, 安全度はきわめて高いことが証明されている.

#### おわりに

酸素輸液の研究はこの 30 年間に, 具体的対象物についての物性と動的機能の相関が解明できるようになってきている. 修飾 Hb を用いる酸素輸液の研究は, 臨床試験の最終段階にきてはいるが,

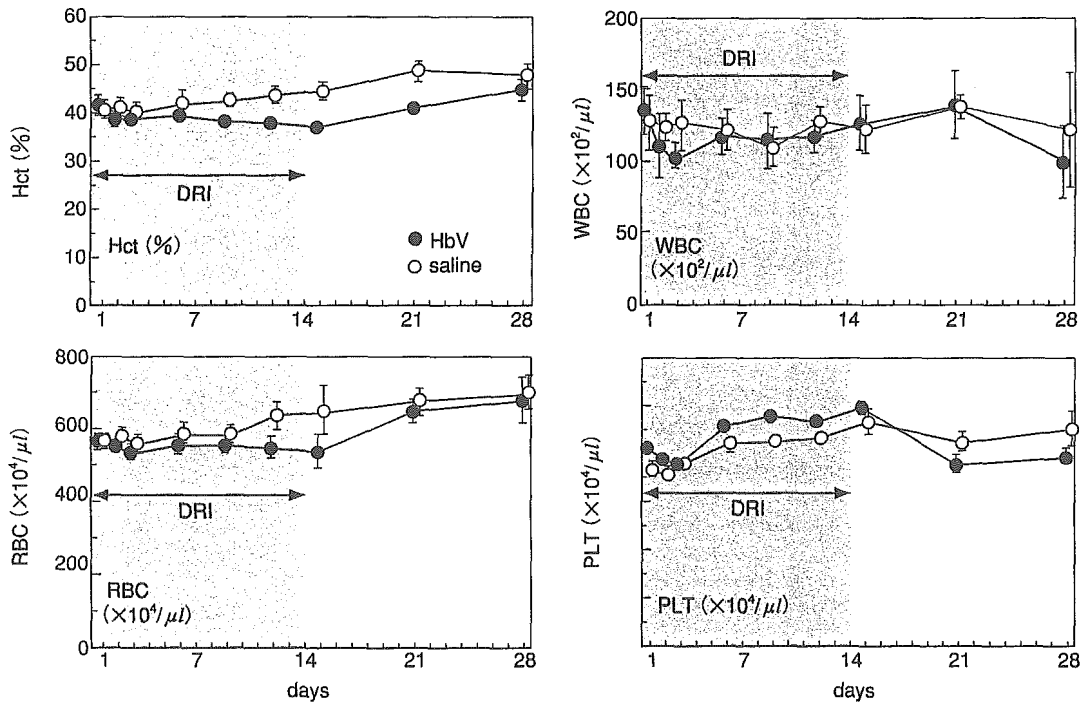


図 9 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験における血液学的検査

図 8 の実験において血球数を測定した結果, ヘマトクリットは投与期間中に低下する傾向があるが, 反復投与終了後 2 週間すると回復する. 血小板数, 白血球数は著変なし.

表 2 人工赤血球の適応症例

輸血代替	その他の適応
1. 出血ショック蘇生液	1. 虚血部への酸素供給(心不全/脳障害/呼吸不全)
2. 術中出血の補充	2. 腫瘍組織酸素化による抗腫瘍効果増強
3. 術前血液希釈	3. 体外循環回路(人工心肺)充填液
4. 急性貧血	4. 組織再生用培養細胞への酸素供給 (肝, 脾, 心筋, 骨髄, 骨, 皮膚, 血管など)
5. 稀少血液型患者への輸血	5. 移植用臓器灌流保存液(肝, 腎, 脾, 腸, 心, 肺など)

各種副作用が問題を提起しており, 結局は赤血球と類似の被覆膜をもつ構造(Hb 小胞体)が理想であるとの結論に至ることになりそうである<sup>28)</sup>. 今回は割愛したが, 別途の展開としてヘム-リン脂質誘導体を利用した小胞体構造の自己集合体, さらにそのアルブミン担持体(アルブミン-ヘム)についても同様の成果が確かめられ, 酸素運搬機能に毒性がないとの実証が得られている<sup>29,30)</sup>. 酸素輸液は赤血球に比較して体内寿命が短いので短期間の利用(1週間以内)に限定すれば, 血液型と感染源がまったくなく, 長期間保存できる点は赤血球の性能を凌ぐと言ってよい. 健常動物(ラット)の場合には投与のみで存命しうること, また早い時間にショック状態から回復が可能であるなど, 輸血代替としての利用はもちろん, さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応(梗塞部位の酸素化, 抗腫瘍効果増強など)も提案されており<sup>31,32)</sup>(表 2), 医療に新しい変革をもたらすことが期待されている.

謝辞: 本研究は, 厚生労働科学研究費補助金(H12-医薬-009)により推進された. ここに記して謝意を表します.

#### 文献

- 1) Tsuchida, E.(eds.) : Blood Substitutes, Present and Future Perspective. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- 2) Tsuchida, E. : *Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **28** : v-xii, 2000.
- 3) Chang, T.M.S. : Blood Substitutes : Principles, Methods, Products, and Clinical Trials. Basel, Karger, 1997.
- 4) Djordjevich, L. and Miller, I.F. : *FASEB. Proc.*, **36** : 567, 1977.
- 5) Sloan, E.P. et al. : *JAMA*, **282** : 1857-1864, 1999.
- 6) Takeoka, S. et al. : *Artif. Organs Today*, **3** : 129-136, 1993.

- 7) Sakai, H. et al. : *Protein Expr. Purif.*, **4** : 563-569, 1993.
- 8) Takeoka, S. et al. : *Langmuir*, **12** : 1755-1759, 1996.
- 9) Naito, Y. et al. : *J. Artif. Organs*, **5** : 141-145, 2002.
- 10) Fukutomi, I. et al. : *J. Artif. Organs*, **5** : 102-107, 2002.
- 11) Sou, K. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **11** : 372-379, 2000.
- 12) Sakai, H. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **11** : 425-432, 2000.
- 13) Izumi, Y. et al. : *Crit. Care Med.*, **24** : 1869-1873, 1996.
- 14) Sakai, H. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **8** : 23-30, 1997.
- 15) Kobayashi, K. et al. : *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **25** : 357-366, 1997.
- 16) Izumi, Y. et al. : *ASAIO J.*, **43** : 289-297, 1997.
- 17) Sakai, H. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **11** : 56-64, 2000.
- 18) Sakai, H. et al. : *J. Biomed. Mater. Res.*, **40** : 66-78, 1998.
- 19) Sakai, H. et al. : *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, **45** : 276 : H553-H562, 1999.
- 20) Sakai, H. et al. : *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283** : H1191-H1199, 2002.
- 21) Wakamoto, S. et al. : *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **29** : 191-201, 2001.
- 22) Ito, T. et al. : *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **29** : 427-438, 2001.
- 23) Sakai, H. et al. : *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279** : 908-915, 2000. ; Nakai, K. et al. : *J. Lab. Clin. Med.*, **132** : 313-319, 1998.
- 24) Goda, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **101** : 604-612, 1998.
- 25) Kyokane, T. et al. : *Gastroenterology*, **120** : 1227-1240, 2001.
- 26) Sakai, H. et al. : *Am. J. Pathol.*, **159** : 1079-1088, 2001.
- 27) Sakai, H. et al. : *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41** : 222-231, 2003.
- 28) Takeoka, S. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **13** : 1302-1308, 2002.
- 29) Tsuchida, E. et al. : *Bioconjugate Chem.*, **11** : 46-50, 2000.
- 30) Tsuchida, E. et al. : *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A** : 257-261, 2003.
- 31) Kobayashi, K. et al. : *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A** : 48-51, 2003.
- 32) Erni, D. et al. : *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284** : H1702-H1709, 2003.

## 招待講演

## 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給

土田 英俊\* 宗 慶太郎\* 酒井 宏水\* 小松 晃之\*  
 武岡 真司\* 堀之内宏久\*\* 末松 誠\*\* 小林 紘一\*\*

## はじめに

全身の細胞呼吸に必要な充分量の酸素供給ができる酸素輸液(毒性なく安全利用できる)の出現は、効果的輸血代替物となりうる。献血由来のヒト血液輸血の難点は、極めて短い保存期間(3週間)と投与に際し、血液型交差試験、感染防止の確認など煩雑さの完全回避にある。それに近未来の献血量不足が推定されるので、その対策も必要となる。緊急時に際し、何処でも何時でも血液型に関係なく、充分量の酸素供給が期待できる輸液の完成は、単に輸血代替だけでなく、災害時の危機対応としての役割も重視されるべきである。このような観点から最近、“安全な血液製剤の安定供給確保に関する法律”も施行(2003年7月)され、安全に使用できる血液製剤代替医薬品の早期完成が国の基本方針となっている。すでに先の総説<sup>1)</sup>にも述べたが、本稿ではその後の進展を含め、著者らが開発しているヘモグロビン(略：Hb)小胞体などに関し、微粒子懸濁液としての体内動態や代謝に焦点を当て、安全度と効果を紹介する。また、アルブミン-ヘム(albumin-heme)に関しても興味深い知見が得られているので併せて紹介する。

## 1. 酸素輸液が期待される背景

血液型に全く関係なく、常に十分量が備蓄され、必要に応じ直ちに安全使用できる酸素輸液が確立され実用に供されることは、近未来医療に不

可欠となる。手術時など輸血が予測できる場合は、自己血を予め貯蔵しての使用が可能であるが、現行医療では一般には不特定個人からの献血による保存ヒト血液の輸血に依存している。いわゆる少子高齢化の社会現象は、献血システムにおける需給平衡にも変化をもたらし、血液不足の深刻化も予測される。最近の献血人口統計は、50歳以下の献血割合が80%以上、逆に輸血受容者数は50歳以上が80%以上を占めている(図1：日赤・東京都健康局調査)<sup>2)</sup>。

日赤血液事業部の継続的努力と検査技術進歩は、献血安全度を国際的高水準にまで向上させ、核酸増幅検査(NAT, 1999)の採用と体制整備も多大の成果を上げたが、感染や非溶血性の副作用などの完全排除にはまだ距離がある<sup>2)</sup>。加えてエボラ出血熱、プリオン、西ナイル熱、新型肺炎ウイルス(SARS)のほか、未知ウイルスの可能性もあり、今後とも、安全な酸素輸液の常備が不可欠の重要度を持つことには変化はない。

## 2. 酸素輸液開発の歴史

血液が肺泡(酸素分圧：110 torr)で結合した酸素を末梢組織(酸素分圧：40 torr)で放出するが、この仕組みは単純にも見えるので、酸素輸液の実現は早くから繰り返し提案されてきた<sup>3)</sup>。最初のパーフルオロカーボン(PFC)乳剤(1982年)の検討は、ようやく酸素天幕内で必要量に近い酸素量の体内輸送ができるのを観測<sup>4)</sup>、次いで赤血球からのヘモグロビン(Hb：分子量65 kDa)利用が取り上げられたが、直接に静注しても短時間(30分以内)に腎組織から尿中に

\* 早稲田大学 理工学総合研究センター

\*\* 慶應義塾大学 総合医科学研究センター

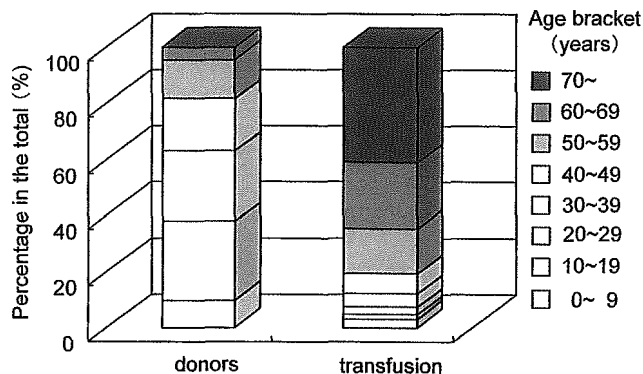


図1 献血者と輸血受容者の年齢層割合  
(献血者 日赤全国統計/輸血受容者 東京都健康局統計/両方共に 2001 年)

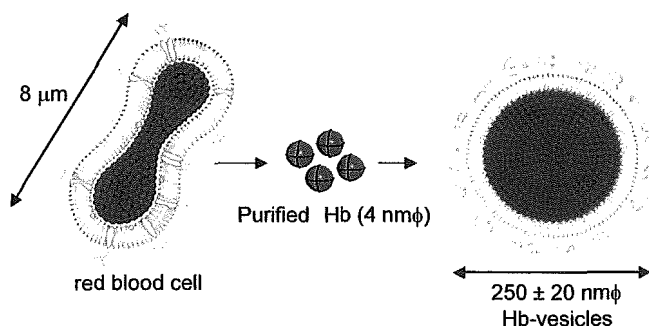


図2 ヘモグロビン小胞体の構造

精製高濃度ヒトヘモグロビン (≥35%) をリン脂質分子二層膜で被覆した微粒子 (直径 200-250 nmφ) で単分散に近い試料として検討済。また、安定系として、水溶性オキシエチレン鎖での表面修飾により安定分散系 (凝集と融合回避) を確立。

排泄され酸素輸液としての役割は果たせない<sup>9)</sup>。しかも、少量投与でも急激な一過性血圧亢進が観測され、顔面発赤など 感冒様の症状が認められる。結局、安定度を向上させるため直接 Hb 分子に加工を加えた、いわゆる修飾 Hb (分子内架橋、重合、高分子結合など) が検討されたのではあるが、投与直後の急激な血圧亢進、軽度の発熱、代謝異常、Hb 酸化体 (met-, ferryl- 体) 接触による細胞壊死 (necrosis) などが明確にされただけで、実用には距離があった<sup>6,7)</sup>。これらの現象は、体内組織への酸素輸送を担っている赤血球の生理的意義、について改めて理解を深めることになった。

このような経緯は、引き続き Hb 小胞体系展開

へつながるのであるが、具体的には精製 Hb の調製、共存蛋白質類 (酵素、膜成分の構成蛋白質など) の完全除去、加えて被覆膜で包まれた、いわば細胞型 (cellular) が必要であるなど、Hb 小胞体が意味を持つことが明らかにされた<sup>8,9)</sup>。溶液としての要件と機能発揮の要件には、分子集合科学、高分子錯体科学を基礎とする考察と制御の試行錯誤を経る継続的努力が結集して、小胞体生理塩水溶液として初めて酸素輸液として満足できる機能と特性値を有する物質系として、誕生することになった。これらの展開については現在、GMP (Good Manufacturing Practice) 基準の設備により得られる試料について、臨床試験の準備が開始されている。

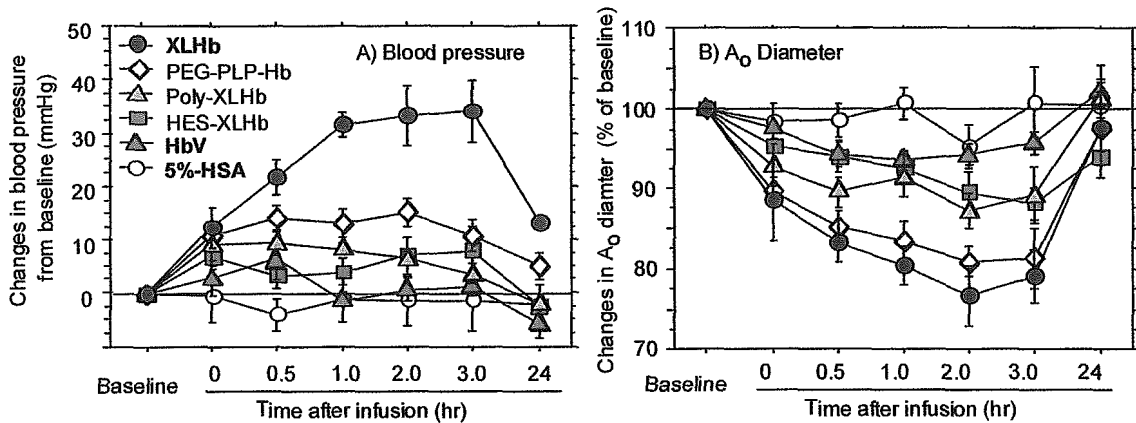


図 3 ヘモグロビン小胞体と修飾ヘモグロビン(被覆膜のない分子状)の比較

無麻酔下，酸素輸液を  $7 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$  (ハムスター) に投与，血圧と抵抗血管径 ( $A_0$ ,  $158 \pm 21 \mu\text{m}\phi$ ) の動態を非侵襲的に観測。修飾 Hb (XLHb:  $7 \text{ nm}\phi$ , PEG-PLP-Hb:  $22 \text{ nm}\phi$ , poly-XLHb:  $47 \text{ nm}\phi$ , HES-XLHb:  $68 \text{ nm}\phi$ ) では，いずれも血圧亢進 (A) と抵抗血管の収縮 (B) を認め，Hb 小胞体 (HbV:  $250 \text{ nm}\phi$ ) で血圧亢進，抵抗血管収縮を認めない。直径  $150 \text{ nm}\phi$  以上の粒子系の投与では，きわめて安定。(文献 20: 図 1)

### 3. Hb 小胞体の安全度と効果の確認

#### 1) 安定構造の追求

実は Hb 小胞体を酸素輸液に利用する考えは，人工赤血球発想の当初から存在した<sup>10,11)</sup>。被覆材料の選定と設計，精製 Hb (純度  $\geq 99.9\%$  以上/濃度  $\geq 35\%$ )，高純度特定組成の被覆膜 (nano size 分子層膜)，小胞体粒径 ( $200\text{-}250 \text{ nm}\phi$ ) の範囲で均一分布，均一粒度分布の生理塩水溶液，溶液物性はヒト血液に同じ，混合安定度あり，加えて効率よい製造工程と安価に供給できる技術の完成によく見通しがついてきている<sup>12-14)</sup>。Hb 小胞体粒子の表面修飾により，小粒ではあるが赤血球と同様に循環系で凝集，融合なしに安定に機能発揮ができ，規格に合った調剤の形で体内浸透圧と同じに調整，この型物質を全く含まない粒子系が結果として Hb の役割を代行でき，Hb 小胞体の酸素親和度<sup>15)</sup>，粒子の半寿命や代謝過程なども調節できる。

この粒子あたり Hb  $3.0 \times 10^4$  個を内包，したがって  $1.2 \times 10^5$  個の酸素を供給できる。この生理塩水分散溶液は膠質浸透圧がないので Hb 濃度を任意に調整でき，通常は  $10 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$  に調整するが，これで赤血球 (Hb:  $3.0 \times 10^8$  個) とほぼ同

量の酸素供給ができる。被覆膜は，リン脂質および電荷脂質 (1,5-bis-O-hexadecyl-L-glutamate-N-succinic acid) を含み， $9.1 \times 10^4$  個のリン脂質分子が構成する。最終的には分子二層膜被覆を利用，強度はこれで充分との結論が得られている。表面には粒子単位表面積あたり  $5.1 \times 10^{-3}$  個  $\cdot \text{nm}^{-2}$  の水溶性高分子鎖 (P(OE)<sub>n</sub>: Mw 5 kDa) を導入，これが粒子安定化 (凝集，融合の防止) に役立っている (図 2)。P(OE)<sub>n</sub> 脂質の含量は，全脂質成分に対してわずか  $0.3 \text{ mol}\%$  であるが，高分子添加凝集試験そのほかから凝集防止に有効な含量として設定，表面のみに配置する方法も確立している<sup>16)</sup>。室温で 2 年間保存後にも粒子径の変化や凝集体の生成は認めず，静脈内投与により血液成分と接触しても安定な分散粒子系として循環する<sup>17,18)</sup>。

#### 2) 微小循環動態への影響

最初の修飾 Hb 製剤 (米，分子内架橋型 HemAssist™, 1998 年) の臨床試験では，前述した裸の Hb 分子に由来する副作用により中断の報道があった。内皮細胞から平滑筋への血管弛緩の情報伝達分子 (NO) を，静脈内投与の Hb 分子が血管内皮細胞と平滑筋の間隙まで浸透して生起する NO 捕捉の結果として，平滑筋の収縮

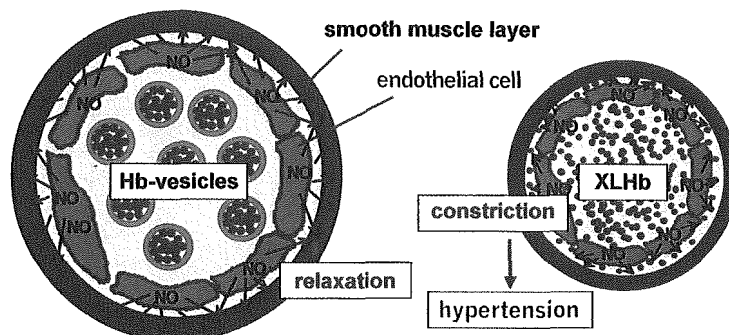


図4 修飾ヘモグロビン投与時に生起する血管収縮

修飾 Hb は内皮細胞由来の弛緩因子 (NO) を捕捉配位するので、濃度低下が血圧上昇の原因となる。毛管直径は最大 2/3 に至る。

(血管収縮) による血圧亢進招来が理由<sup>8,19)</sup>とされている。筆者らは、M. Intaglietta (UCSD) とも共同して、ハムスター皮下の微小循環を window chamber 経由の顕微鏡システム利用で、投与直後からの血流動態や、毛細血管径の動的变化を経時的に詳細解析して、Hb 小胞体では [P(OE)<sub>n</sub> 鎖] 修飾による安定度向上により、安定な循環挙動が計測でき、血流状態に全く影響<sup>18)</sup>を与えないこと、各種条件の酸素輸液投与時の抵抗血管径と血圧の変動観測を実施した (図3)。修飾 Hb (特に分子内架橋 Hb の場合) が最も抵抗血管径収縮が顕著 (管径で 1/3 の収縮) であり、同時に相当する血圧亢進が観測される。この収縮は末梢循環阻害と組織の酸素供給量を低下させる。収縮は粒径の大きさ、あるいは投与量に比例して小さくなり、直径 250 nmφ の Hb 小胞体では血管収縮も血圧亢進も認められなくなる<sup>20)</sup>。この Hb 小胞体は、開発推進している酸素輸液では最大の粒子径対象の製剤であり、修飾 Hb のように血管内皮細胞の間隙に浸透しないため、NO 捕捉による副作用は一切認めない (図4)。

一般に生体内のガス分子 (NO あるいは CO) の役割は、情報伝達因子として見出され、正常肝臓で CO が血管拡張因子として作動することが観測されている<sup>21)</sup>。肝臓では、肝実質細胞に存在する hemoxygenase (HO-2) がヘムを分解する際に CO を放出するが、Hb は類洞内皮細胞間の細孔 (fenestration 直径: 100-150 nmφ) を透過して Disse 腔に到達し、CO 捕捉 (親和度は酸素

の約 200 倍<sup>22)</sup>) により血管収縮を生起させる。

例えば、摘出肝臓での灌流実験では、Hb で血管抵抗の上昇と類洞の狭小化が観測されるが、metHb (CO の結合なし) の場合ではこれら変化は観測されない、また fenestration 細孔径より大きい size の Hb 小胞体では血管収縮を全く生起しないことが確認されている (図5)<sup>23)</sup>。

### 3) 血液成分との相互作用

小胞体制剤の免疫系への影響は、補体活性化や血小板活性化の作用など報告<sup>24,25)</sup>があるが、Hb 小胞体の場合ではこれら副作用を認めない。構造明確な高純度脂質分子を膜成分に使用し、免疫系への作用を判断しながら選定しているため高い血液適合性があり、ヒト血液との混合試験では血液凝固、血小板凝集、セロトニン放出、カリクレイン-キニン系への影響など、従来報告にある小胞体の問題点と指摘されてきた諸因子に著しい改善が見られ、投与試験 (ラット) でも補体活性化、血小板凝集などを認めない<sup>26,27)</sup>。

免疫系の制御因子 [インターロイキン (IL), インターフェロン (IFN), 腫瘍壊死因子 (TNF)] などの情報伝達分子群 (サイトカイン) の計測にも意を払っている。酸素輸液の投与を想定する出血時投与では、創傷治癒や造血因子にかかわる多くのサイトカイン類の放出が想定されるが、酸素輸液投与時の評価は、これらサイトカイン類の生理的産生カスケードの妨害による生理機能低下や、異常産生による副作用の両面からの検討が重要となる。血液製剤については、保存中に



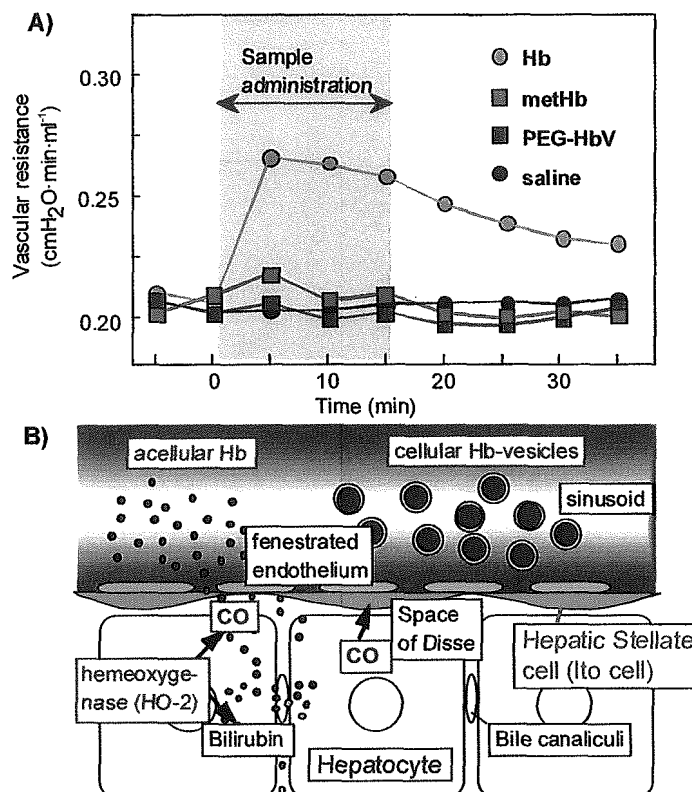


図5 ヘモグロビンの代謝と肝微小循環動態

A：精製 Hb 溶液を用いた摘出肝灌流での灌流圧上昇。Hb 小胞体と metHb 投与の場合には灌流圧上昇がない。(文献 23：図 2 を改変引用)

B：灌流圧変動の仕組み。CO は類洞血管を覆う Ito 細胞に血管弛緩因子となっているのを解明。

白血球や血小板から放出されるサイトカインによる副作用が懸念<sup>28)</sup>されるが、Hb 小胞体では製剤自体からの産生がない点は確かに利点である。A.S. Rudolph<sup>29)</sup> は、Hb 内包小胞体投与に際して血中の IL-6 や TNF- $\alpha$  測定値の上昇を報告。この場合、培養細胞では肝臓や脾臓のマクロファージや内皮細胞からの放出が明らかにされている<sup>30)</sup>。Hb 小胞体とヒト血液との混合試験では、現在のところ血小板由来の炎症性サイトカイン (RANTES) 放出は認めないが、無菌、かつ発熱物質混在のないことが保証された Hb 小胞体系についてのサイトカイン産生カスケードに関する *in vivo* 試験を開始しているので、いずれ詳細が明らかになる。

4) Hb 小胞体投与後の体内分布と代謝

Hb 小胞体の体内動態の検討は W.T. Phillips (San Antonio, U. Texas) との共同で推進、Hb 小胞体に導入されている少量のホモシステインのチオール基に結合した technetium-99 m (<sup>99m</sup>Tc, 半減期 6 時間) を追跡子とし、これをラットに静注 (血液量の 25% に相当)、血中残存率と体内動態の経時変化を  $\gamma$ -camera で追跡、血中半減期は 35 時間で肝、脾、骨髄の細網内皮系に捕捉、投与後 24 時間で捕捉量は一定値となる<sup>31)</sup> (図 6)。投与後 48 時間には Hb 小胞体投与全量の 10.9 $\pm$ 0.8% が肝、6.6 $\pm$ 0.3% が脾に集中、摘出した肝と脾の病理組織学的解析から、Hb 小胞体は肝のクッパー細胞および脾のマクロファージに捕捉されるのが明らかになっている<sup>32)</sup>。

血液生化学検査では、Hb 小胞体を捕捉した後

でも肝組織機能を反映する酵素 (GOT, GPT) 濃度に著変を認めず, 正常に維持されていると判断される。免疫抗体染色法を利用してラット肝臓および脾臓中で, Hb 小胞体由来のヒト Hb およびリン脂質成分の代謝を追跡した結果, いずれの臓器からも投与後 7 日以内にほぼ消失する (図 7)<sup>32)</sup>。Hb 小胞体の代謝は, クッパー細胞やマクロファージでの老化あるいは損傷した赤血球代謝と同経路であり, Hb 製剤として適した経路といえる<sup>33)</sup>。

以上述べたように酸素輸液の安全度確保には, 生体組織の濾過現象の理解, micro と macro な視点から投与試料の体内動態把握, 代謝まで含めた製剤設計が必要となる。微粒子製剤では, 粒子径が  $3 \mu\text{m}\phi$  以上の場合には主に肺の毛細血管栓塞が発生<sup>34)</sup>, 粒子径が  $1-3 \mu\text{m}\phi$  では赤脾髄組織の網目構造での捕捉<sup>35)</sup>,  $150 \text{ nm}\phi$  以下になると先述の類洞細孔 (fenestration) 透過が問題となる<sup>36)</sup>。さらに, 除菌フィルタ処理 (孔径  $0.22 \mu\text{m}\phi$ ) 可能, 内包効率などの静注製剤化の要件を含め, 安全投与できる Hb 小胞体の最適粒径 ( $150-300 \text{ nm}\phi$ ) と均一粒度分布が重要な意味を持つことになる (図 8)。

#### 4. 血液と比較した酸素輸送の効果

Hb 小胞体の有効性は, 酸素輸送量, 酸素消費量, 混合静脈血酸素分圧, 臓器の組織酸素分圧や pH, 乳酸/ピルビン酸比などを指標とし<sup>37)</sup>, 末梢組織まで血液と同量の酸素輸送が確認されている。Hb 小胞体はアロステリック因子としてピリドキサーール 5'リン酸を共存させ, 酸素親和度 ( $P_{50}$ ) を赤血球同等の 27-32 torr に設定, Hb 濃度 ( $10 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ ) は血液中の濃度 ( $15 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ ) より若干低めに設定。Hb 小胞体自体での酸素輸送を実証するモデル (ラット) では, 血液量の 90% 近くまで Hb 小胞体で交換輸血して, 血液循環動態, 血圧, および組織酸素分圧を計測したところ, 赤血球と同等の酸素輸送量と生存を保証できることが明示された (図 9)<sup>38)</sup>。ラット血液の 50% を脱血し出血性ショック状態とした後, 脱血液と等容量の Hb 小胞体を静注投与して, 酸素輸送因子を計測したところ, 脱血前の数値に回復が

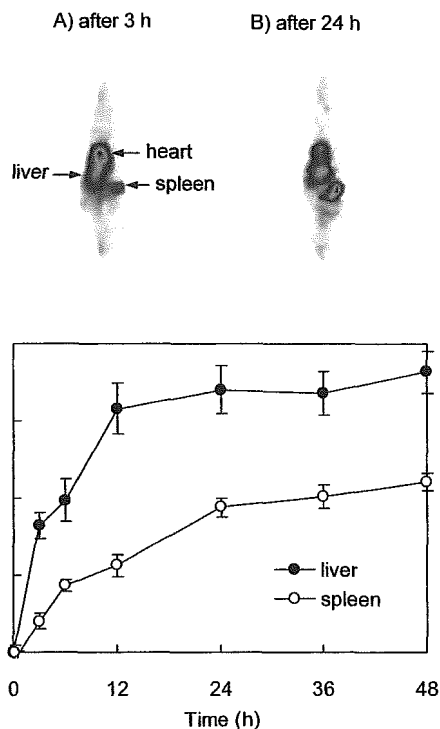


図 6 標識ヘモグロビン小胞体投与後の  $\gamma$ -camera 像と臓器捕捉量の経時変化

標識 Hb 小胞体を負荷投与 (ラット血液の 25% 相当量), 経時的  $\gamma$ -camera 像から肝と脾への捕捉量を観測。Hb 小胞体は肝や脾の細網内皮系に捕捉され, 投与 3 時間後では心臓の血液プール (A), 24 時間後では肝と脾に多く検出される (B)。捕捉量は投与後 24 時間で一定値となる。

確認された<sup>39,40)</sup>。

#### 5. Albumin-heme (アルブミン-ヘム) の安全度と効果の確認

##### 1) 安定構造と物性

最近では組換えアルブミン (rHSA: Mw. 66 kDa) の生産供給が進行している。著者らは, rHSA と精密合成のヘム誘導体が自発的に分子集合することを見出し, これを albumin-heme (アルブミン-ヘム) と命名<sup>41)</sup>。rHSA は 1 分子で最大 8 個もヘム誘導体を包接でき, 酸素分圧に応じて酸素を吸脱着できるので酸素輸液として機能できる。動力学計算結果では, rHSA 疎水場にヘム誘導体を包接した構造が熱力学的に最安定と

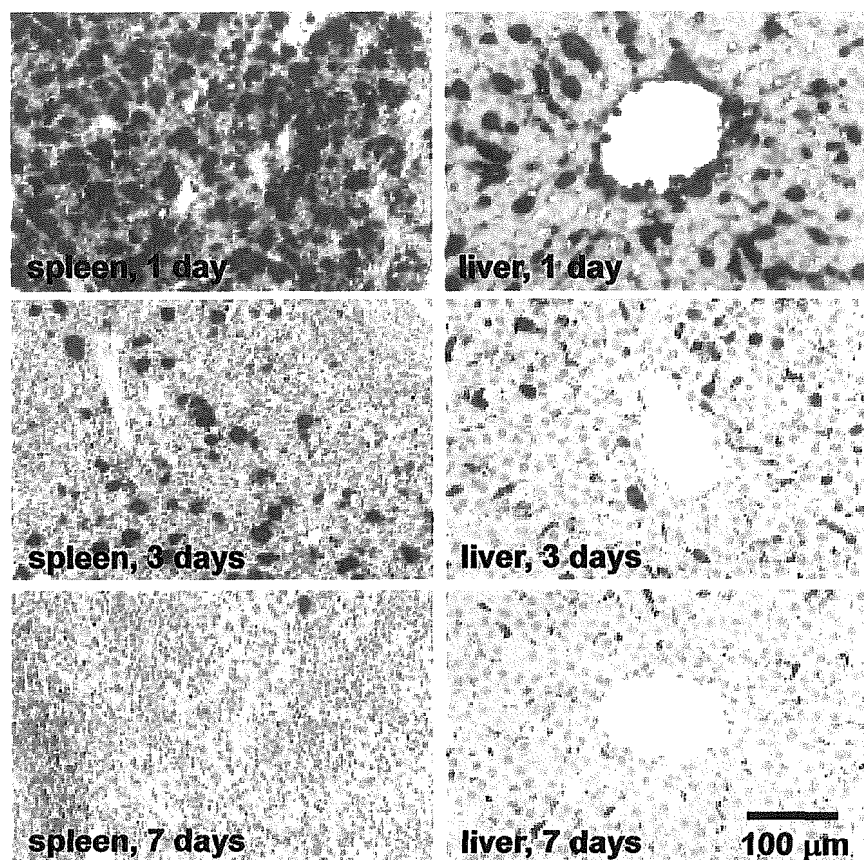


図 7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

Hb 小胞体投与後のラット肝，脾組織の顕微鏡写真。

抗ヒト Hb 抗体染色による赤染はヒト Hb の存在部位を示す。投与 1 日後では多量ヒト Hb の存在を認めるが，7 日後には消失し，蓄積は認めない（文献 32：図 3）。

なり（図 10），X 線結晶構造解析から，より詳細構造の追及を開始している。物理化学的測定では，ヘム誘導体を包接した後も rHSA の高次構造，表面電荷，溶液物性などの数値から，包接前と変わらないことが証明され<sup>42)</sup>，酸素親和度は heme 化学構造を変化させ任意に調整でき，当然ヒト赤血球と同等にも調節できる<sup>43)</sup>。この赤褐色透明の溶液は，室温で 1 年間保存しても変化せず，安定溶液として長期保存できる<sup>44)</sup>。

## 2) 安全度と酸素輸送効果

Albumin-heme は Hb で問題となる NO 捕捉による血管収縮（血圧亢進）を示さない（図 11）<sup>45)</sup>。これは rHSA 表面の等電点（pI：4.8）によるものであり，内皮外側にある基底膜との静

電反発が内皮からの漏出を防止するため，血管壁透過度は Hb と比較して 1/100 程度と低いことに起因している。出血ショックモデル（ラット）へ albumin-heme 溶液を投与すると，血圧，血流量は回復し，主要臓器や末梢組織の酸素分圧も上昇，生体内でも albumin-heme が酸素を輸送していることが実証されている<sup>46)</sup>。また最近では，小粒径（8 nmφ）の特徴を利用して，腫瘍組織内に存在する低酸素領域の酸素化に有効が明らかにされている<sup>47)</sup>。体内分布や代謝過程など安全度に関する知見が集積してきているので，間もなく最適分子構造と適応条件が確定できる見通しである。

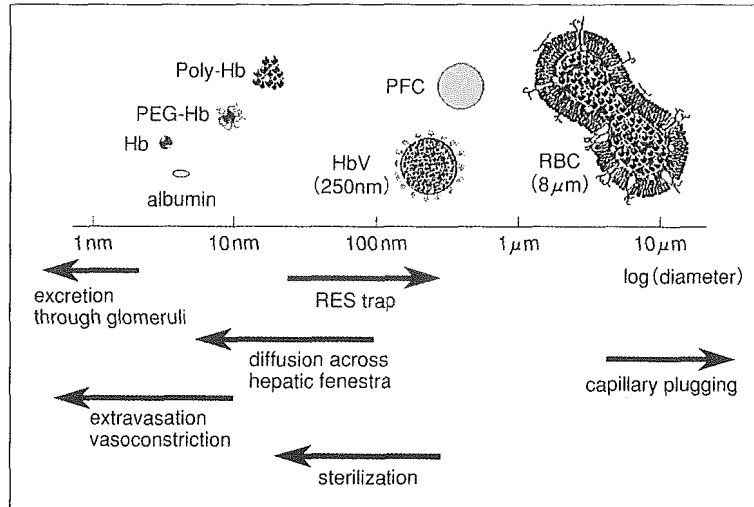


図 8 酸素輸液の開発  
 酸素輸液としての最適粒径 (150-300 nm $\phi$ ) の予測。

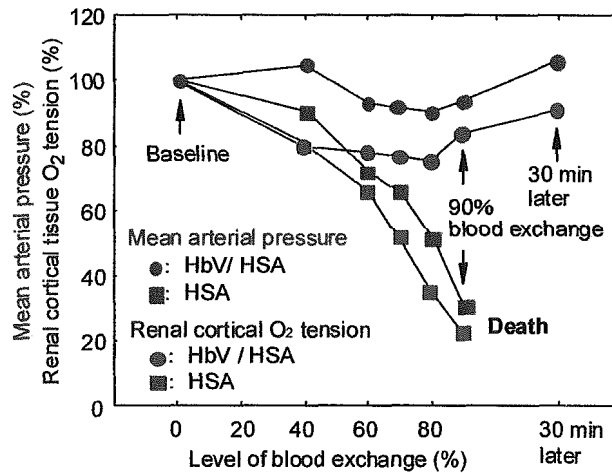


図 9 ヘモグロビン小胞体による交換輸血試験  
 $\gamma$ HSA 5%溶液で全血液量の 90%を置換すると、血圧、組織内酸素量 (腎皮質酸素分圧) も低下、ただちに死亡。これに対し、Hb 小胞体/HSA で置換した場合は、初期値をほぼ維持して生存できる (文献 38: 図 5, 7)。

ま と め

酸素輸液の用途は非常に多岐にわたると同時に、災害などの緊急時に際して効率よく多量の生産と常備達成に対応できるとする幅広い期待がある。現在、医療分野から提案のある適応では、出血ショック蘇生液としての適応はもちろん、術中出血の補充、術前血液希釈、急性貧血、あるいは

は稀少血液型患者への輸血など輸血代替としての利用に加え、虚血部位への酸素供給<sup>48,49)</sup>、腫瘍組織酸素化による抗腫瘍増強<sup>47)</sup>など、治療効果を期待する新しい適応にも成果が出てきている (表 1)。

日赤血液センターからの期限切れ赤血球利用の依頼を受けて、酸素輸液の展開に尽力してきたが、遺伝子組換え技術の進歩により近い将来には

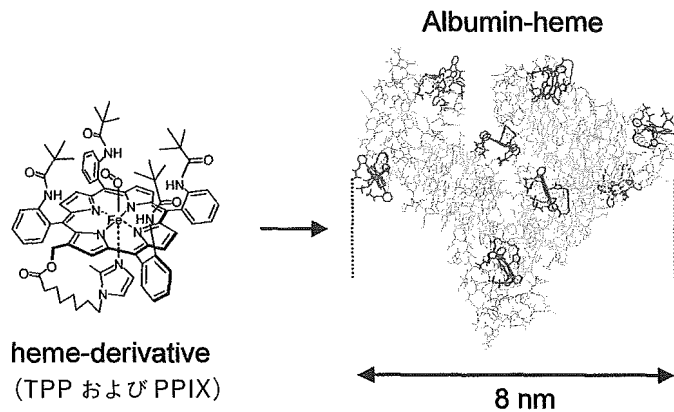


図 10 アルブミン-ヘムの構造  
 アルブミンにヘム誘導体を包接させた分子。ヘム誘導体は最大 8 個まで包接され、酸素輸液として機能する。

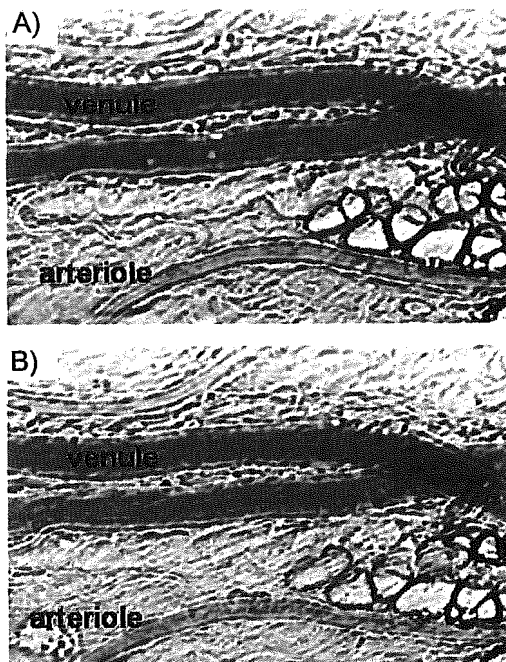


図 11 アルブミン-ヘム投与後の微小循環動態  
 ラット腸間膜のビデオ画像。(A) アルブミン-ヘム投与前、(B) アルブミン-ヘム投与後 90 秒の比較では、腸間膜細動脈径と細静脈径ともに全く変化なし。(文献 45: 図 2, video 記録)

Hb は工場生産できることになろう。現在の課題は、脂質二分子層膜で高濃度 Hb を封入するナノ制御技術のシステム化およびその設備設置を早急に完了させ、非臨床試験により有効性、安全性の

表 1 酸素輸液適応への期待

適応例
輸血代替
出血ショック蘇生
術中出血液の補充
術前血液希釈
急性貧血
稀少血液型患者への輸血
酸素療法
虚血部への酸素供給 (心不全/脳障害/呼吸不全)
腫瘍組織酸素化による抗腫瘍増強効果
体外循環回路 (人工心肺) 充填液
組織再生用培養細胞への酸素供給
(肝, 脾, 心筋, 骨髄, 骨, 皮膚, 血管など)
移植用臓器灌流保存液
(肝, 腎, 脾, 腸, 心, 肺など)

確認を順次進めることであり、併せて治験プロトコルの作成も進行する必要がある<sup>50)</sup>。

1970 年代から着手された酸素輸液開発の研究において、観測法進歩により当初予測しなかった新知見の集積、必要な淘汰を経て最適系に絞られてきた。細胞型酸素輸液の開発には高度の分子集合技術が必要とするため、比較的容易に製造できる修飾 Hb が先行した経緯がある。しかし、Hb 利用には赤血球のように被覆膜 (細胞構造) が不可欠である。アルブミン-ヘムの場合は、アルブミンが等電点 (pI: 4.8) であり電荷の相違が内

皮細胞との反発を招来するため、接近できないのが原因であろう<sup>46)</sup>。新しい適応分野も拓けてきているので、各製剤の特徴を活かして、今後ますますの発展が期待されている。

謝辞：本稿に紹介の研究成果は、厚労科学研究費補助金 (H 9-14/代表者 土田英俊) (H 15-17/代表者 小林紘一) により推進された内容を主としている。ここに記して謝意を表する。

#### 引用文献

- 1) 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 宗慶太郎, 小林紘一. 酸素輸液 (人工赤血球). 医学のあゆみ 2003 ; 205 : 558-66.
- 2) 池田久賢. 次世代の血液製剤を考える. エフ・コピント. 富士書院 (札幌) ; 2003. p.3-13.
- 3) Tsuchida, E, editor. Blood substitutes. Present and future perspective. Amsterdam : Elsevier ; 1998.
- 4) Mitsuno T, Ohyanagi H, Naito R. Clinical studies of a perfluorochemical whole blood substitute (Flosol-DA) Summary of 186 cases. Ann Surg 1982 ; 195 : 60-9.
- 5) Manning LR, Morgan S, Beavis RC, Chait BT, Manning JM, Hess JR, et al. Preparation, properties, and plasma retention of human hemoglobin derivatives-comparison of uncrosslinked carboxymethylated hemoglobin with cross-linked tetrameric hemoglobin. Proc Natl Acad Sci USA 1991 ; 88 : 3329-33.
- 6) Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. Free Radic Biol Med 1997 ; 22 : 1075-99.
- 7) Yeh LH, Alayash AI. Redox side reactions of haemoglobin and cell signalling mechanisms. J Intern Med 2003 ; 253 : 518-26.
- 8) Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. Bioconjug Chem 2000 ; 11 : 56-64.
- 9) Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, Tsuchida E. Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction and lipid peroxidation. Bioconjug Chem 2002 ; 13 : 1302-8.
- 10) Tsuchida E, editor. Artificial Red Cells. New York ; John Wiley ; 1995. (Kambara S, Kimoto S, 1965-1971)
- 11) Djordjevich L, Miller IF. Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. Exp Hematol 1980 ; 8 : 584-92.
- 12) Takeoka S, Ohgushi T, Terase K, Ohmori T, Tsuchida E. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. Langmuir 1996 ; 12 : 1755-9.
- 13) Sakai H, Masada Y, Takeoka S, Tsuchida E. Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-vesicles for an artificial oxygen carrier. J Biochem 2002 ; 131 : 611-7.
- 14) Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using the freeze-thawing and extrusion. Biotechnol Prog 2003 ; 19 : 1547-52.
- 15) Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O<sub>2</sub> affinity. Am J Physiol 1999 ; 276 : H 553-62.
- 16) Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. Bioconjug Chem 2000 ; 11 : 372-9.
- 17) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. Bioconjug Chem 2000 ; 11 : 425-32.
- 18) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, et al. Subcutaneous microvas-

- cular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1997; 40: 66-78.
- 19) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric-oxide release accounts for the biological-activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
- 20) Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H 908-15.
- 21) Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem. Biophys Res Commun* 1994; 205: 1333-37.
- 22) Wyman J, Bishop G, Richey B, Spokane R, Gill S. Examination of Haldane's first law for the partition of CO and O<sub>2</sub> to hemoglobin A0. *Biopolymers* 1982; 21: 1735-47.
- 23) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, et al. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998; 101: 604-12.
- 24) Szebeni J. The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998; 15: 57-88.
- 25) Reinish LW, Bally MB, Loughrey HC, Cullis PR. Interactions of liposome and platelets. *Thromb Haemost* 1988; 60: 518-23.
- 26) Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001; 29: 191-201.
- 27) Abe H, Yamaguichi M, Fujihara M, Wakamoto S, Hirayama J, Takeoka S, et al. Effect of hemoglobin vesicles on blood cells and complement in rat. Abstract in 9-International Symposium on blood substitute. *人工血液* 2003; 11: 114.
- 28) 藤原満博, 岩本志乃舞, 池淵研二, 東 寛, 池田久實. 保存による血液製剤中のサイトカインレベルの変化. *日本輸血学会誌* 2002; 47: 829-36.
- 29) Rollwagen FM, Gafney WC, Pacheco ND, Davis TA, Hickey TM, Nielsen TB, et al. Multiple responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH): Effects on hematopoiesis and serum IL-6 levels. *Exp Hematol* 1996; 24: 429-36.
- 30) Zhu XL, Pacheco ND, Dick EJ, Rollwagen FM. Differentially increased IL-6 mRNA expression in liver and spleen following injection of liposome-encapsulated haemoglobin. *Cytokine* 1999; 11: 696-703.
- 31) Sou K, Klipper R, Goins B., Phillips WT, Takeoka S., Tsuchida E. Pharmacokinetics of the hemoglobin-vesicles (HbV) in rats. Abstract in 9-International Symposium on blood substitute. *人工血液* 2003; 11: 117.
- 32) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, et al. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001; 159: 1079-88.
- 33) 末松 誠, 京兼隆典, 二村雄次, 石村 巽. ヘム分解の生化学から見た人工酸素運搬体の設計戦略. *人工血液* 2000; 8: 40-2.
- 34) Saari M, Vidgren MT, Koskinen MO, Turjanmaa VM, Nieminen MM. Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. *Int J Pharm* 1999; 181: 1-9.
- 35) Desai AG, Thakur ML. Radiopharmaceuticals for spleen and bone marrow studies. *Semin. Nucl Med* 1985; 15: 229-38.
- 36) Scherphof GL, Daemen T, Romero ED, Kamps

- JAAM, Liposome elimination by non-phagocytic cells of the liver. *J Liposome Res* 2000; 10: 431-42.
- 37) 小林紘一. 人工赤血球 (人工酸素運搬体) ②酸素輸送能の評価. *血液・免疫・腫瘍* 2001; 6: 19-28.
- 38) Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, et al. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug Chem* 1997; 8: 23-30.
- 39) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H 1191-99.
- 40) Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Yamamoto M, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med* 2003; (in press).
- 41) Tsuchida E, Ando K, Maejima H, Kawai N, Komatsu T, Takeoka S, et al. Properties of and oxygen binding by albumin-tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivative complexes. *Bioconjug Chem* 1997; 8: 534-8.
- 42) Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, Tsuchida E, Physicochemical properties and O<sub>2</sub>-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivatives. *Bioconjug Chem* 1999; 10: 82-6.
- 43) Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E, Effect of heme structure on O<sub>2</sub>-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O<sub>2</sub>-adduct complex. *Bioconjug Chem* 2002; 13: 397-402.
- 44) Tsuchida E, Komatsu T, Yanagimoto T, Sakai H. Preservation stability and in vivo administration of albumin-heme hybrid solution as an entirely synthetic O<sub>2</sub>-carrier. *Polym Adv Tech* 2002; 13: 845-50.
- 45) Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa A, Sakai H, Kobayashi K, et al. Human serum albumin incorporating synthetic heme: Red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* 2003; 64 A: 257-61.
- 46) Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, et al. Exchange transfusion with albumin-heme as an artificial O<sub>2</sub>-infusion into anesthetized rats: Physiological responses, O<sub>2</sub>-delivery, and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjug Chem* 2000; 11: 46-50.
- 47) Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, Matsukawa Y, Horinouchi H, Watanabe M, et al. Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* 2003; 64 A: 48-51.
- 48) Contaldo C, Schramm S, Wettstein R, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O<sub>2</sub> affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H 1140-7.
- 49) Erni D, Wettstein R, Schramm S, Contaldo C, Sakai H, Takeoka S, et al. Normovolemic hemodilution with Hb vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H 1702-9.
- 50) 高折益彦. 人工血液 (HbV) 安全性, 有効性に関する治験計画. *人工血液* 2002; 10: 99-106.



## 赤血球代替物を用いる蘇生法による外傷後過剰炎症反応の変化

### Alteration of the postinjury hyperinflammatory response by means of resuscitation with a red cell substitute.

Johnson JL, Moore EE, Gonzalez RJ, Fedel N, Partrick DA, and Silliman CC.  
Department of Surgery, Denver Health Medical Center, Denver, CO 80204, USA.

(訳者) 酒井宏水・土田英俊\*  
Hiromi Sakai, Eishun Tsuchida

#### 訳者のコメント

北米企業を中心とした修飾Hbの臨床試験は最終段階に到達し、BLA (Biologics License Application) 申請した企業もあるが、各種副作用が問題となって開発を中断した企業も続出している。Baxter社が大々的に展開した分子内架橋型Hb (HemAssist, DCLHb) は、血管収縮と血圧亢進、食道の蠕動運動の異常など各種副作用の問題が続出し、また有意な蘇生効果も得られず<sup>1)</sup>、1998年にPhase III試験の継続を断念したことは本研究領域全体にとって衝撃的な出来事であった。その後Somatogen社を吸収しpoint mutationによりNO結合に対する親和度を低減させたりコンビナントHb分子に更にPEG鎖を結合させた究極的な修飾Hbの開発に移行していたが<sup>2)</sup>、十分な問題解決には至らずBaxter社は2003年に完全撤退を宣言した。他方、Hbを重合して分子量を増大させて血中滞留時間を延長させる試みは、① glutaraldehyde重合ヒトHb (PolyHeme™, Northfield社)、② glutaraldehyde重合ウシHb (Hemopure™, Biopure社)、③ o-raffinose重合ヒトHb (Hemolink™, Hemosol社) が知られている。このうちHemosol社は臨床試験で十分な効果が認められず2003年に中断している。Biopure社のHemopure™は南アフリカで臨床での使用が認可され、昨年東京で開催された第9回血液代替物国際会議でも、乳癌再建手術での使用例の発表があった<sup>3)</sup>。またアメリカで愛玩動物 (イヌ) への使用が認められている (Oxyglobin™)。Biopure社の臨床試験結果に関する報文数は業界では最も多く、臨床認可が期待されているが<sup>4,5)</sup>、狂牛病の問題も絡み否定的な見方もある。

Northfield社のPolyHemeは、グルタルアルデヒド重合ヒトHb (平均分子量150 kDa, [Hb] = 12~14 g/dL, 膠質浸透圧: 20~25 Torr) である。血圧亢進が生起しないことを主張し<sup>6)</sup>、臨床試験も順調に進行しているようであるが、臨床試験結果の公表は幾つかのCase Reportに留まっていた<sup>7,8)</sup>。しかし昨年PolyHemeを重症患者に投与した後の炎症反応の程度を、サイトカイン産生量の測定から評価し、輸血した場合と比較をした内容が発表された。サイトカインは免疫細胞から産生される糖蛋白質群 (分子量: 5~100 kDa) の総称であり、細胞間の情報伝達物質として多様な生理活性を有していることから、免疫反応を理解する情報源となる。本論文ではPolyHemeの酸素運搬効果については記述が無く、また被験者数が少ないためデータの統計処理に問題があり決定的なことが言えていない印象が強いが、副作用の多い「輸血」に対する人工酸素運搬体の優位性が主張され、本研究分野全般にとって参考となる文献であると考えられるので以下に紹介したい。

尚、図表は著作権の問題があるので割愛するが、内容は文章から十分に理解できると思われる。興味ある方は原著を一読して頂きたい。

#### 緒言

出血ショック時の蘇生法において最も重要なのは酸素運搬の回復である。一般的には先ず晶質液の投与で循環血液量を回復し、次いで必要に応じて濃厚赤血球 (packed red blood cells,

\*早稲田大学理工学総合研究センター 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1  
Phone, 03-5286-3120; Fax, 03-3205-4740; E-mail, eishun@waseda.jp  
論文受付論文受付 2004年1月21日 受理 2004年1月29日

PRBCs)を投与し酸素運搬量の増大をはかる。しかし、PRBCsの予期せぬ様々な副作用も近年特に強く認識されている。輸血の副作用としては主に、感染と免疫炎症反応 (immunoinflammation) がある。

感染症については、HCVやHIV感染の可能性が未だ統計的に残されているように不安が残るし、新たな感染源出現の可能性もある。例えばプリオン (変異クロイツフェルト-ヤコブ病) や人獣共通感染症 (西ナイルなど) 感染の可能性は、今後集中して検討する必要がある。感染回避のために献血者プールを狭めればPRBCsの供給と利用システムへの影響は多大であろう。

ごく最近の配慮すべきこととして、また本研究の課題として、PRBCsの免疫炎症反応がある。輸血に免疫変調作用があることは周知の事であり、事実、臓器移植の歴史の初期では、これが治療のendpointであった。以来、輸血に起因する炎症反応、感染、および腫瘍再発について詳しく報告されている。PRBCsには、酸素運搬の役割だけでなく、生理活性作用もあることは明らかである。

外傷患者が死に至った場合、多臓器不全 (MOF) が原因であることが多い。その詳細な機序は明らかでは無いが、抑制不能な全身的炎症反応がその根本と考えられている。これを裏付ける事実として、好中球 (PMN) 機能と内皮細胞 (EC) 活性の変化がみられた後にMOFが生起することが動物モデルや外傷患者で観察されている。PRBCsに含有する生理活性物質によるPMNまたはECの機能変化が、postinjury MOFへ達する過程に影響を及ぼす。

MOFの原因がPRBCsであることを示唆する例もある。8年前に我々は、外傷後初期の輸血がMOF発生の危険因子であることに気付いた。そして多くの専門分野から構成された研究班を発足し、根本的原因を追求した。最大の焦点は、PRBCs保存中に産生される物質が炎症反応を変化させることであった。ここ10年間の研究結果から、PRBCsに含有する脂質やサイトカインメディエータがPMNとECの生理に変化をもたらすことが明らかとなった。

保存PRBCsの血漿分画は、PMNsとECの両方に対して炎症作用 (proinflammatory effect) を示す。この血漿分画にPMNsを加えインキュベートすると、表面に接着分子 (CD11b/CD18) の発現や、刺激に対する細胞毒性産物 (過酸化水素、エラストアーゼ) 産生の亢進などの反応を示した。血漿分画の脂質成分も生理活性を示す。同様にPRBCs由来の脂質メディエータ類似体をECに作用させると、接着分子発現量が増大する。これらの効果は総じてECのPMNに対する親和性を増大させ、またPMNが炎症反応を促進し自己毒性な組織障害をもたらす。外傷時の輸血に関連する刺激/活性化の実験によって、PMN/EC接着とEC障害が結果として得られた。

我々は、外傷患者の蘇生において、PRBCsの代わりに重合ヒトHb (PolyHeme) を使用する機会を得た。重傷患者にこの物質を投与することで、我々は免疫炎症反応についてPRBCsとPolyHemeで比較することが可能となった。このHb利用酸素運

搬体は、脂質成分を含まず、サイトカインも含まず、全てに適合した修飾ヒトHb溶液であり、開発の最終段階にある。In vitro試験では、PolyHemeがPMNを刺激しないこと、またECを活性化しないことが解っている。我々は重合ヒトHbで蘇生した場合にはPMN細胞毒性potentialは安定し、PRBCsで蘇生した場合にはPMN細胞毒性potentialの亢進がみられ、PRBCsが外傷後PMNを刺激する仮説と一致していた。

従来観察されたPMN刺激の相違が全身的な炎症反応の低下を示しているかどうかは不明である。炎症反応の評価法の一部として、proinflammatory (炎症性) サイトカイン (IL-8, IL-6 など) と、免疫調節性 (counterregulatory) サイトカイン (IL-10, IL-11など)、内皮細胞活性化の指標として (可溶性細胞内接着蛋白質: sICAM) および可溶性E-セレクトリン (sE-selectin) を測定した。本研究では、重合ヒトHbで蘇生した場合とPRBCsで蘇生した場合で、サイトカインレベルに相違があるか確認することを目的とした。

## 方法

### 患者の選択

輸血が必要と判断された17歳以上の外傷患者を対象とした。我々の従来の危険度検査では、外傷重症度 (injury severity) と投与PRBCsユニット数から判断した外傷の程度がMOF発生の予測因子であったので、このプロスペクティブ臨床研究においても、外傷後12時間以内に6ユニット以上のPRBCs投与を受けると予想されるInjury Severity Score (ISS) が15以上の患者を対象とした。被験者は、重合Hb (20 ユニット以下、或いは1000 g Hb) 或いは貯蔵されていた赤血球を、最初の酸素運搬蘇生液として投与を受けた。24時間生存しなかった患者は対象外とした。本研究は、研究施設評価委員会の承認を得たプロトコールに沿って実施され、また、研究ボランティア保護の原則に従った。

追加輸血必要の目安は、晶質液投与後の低血圧改善が必要となったとき、生理学的に顕著な貧血状態 (例えば酸素抽出率が30%以上) になったとき、或いは極度な貧血 (Hb < 7 g/dL) になったときとした。この措置は両群とも同様に行った。血圧、心拍数、pHなどのパラメータ、輸血量、年齢、およびISSを集計し、MOF研究のデータベースの一部とした。PRBCsは、保存間に白血球除去の処理をしなかった。

### 採血液検体の調製とサイトカイン測定

ヘパリン加全血を外傷後できるだけ早く採取し (0 hr、或いはベスライン)、その後の採血時間を3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 120時間とした。3時間以内に採血出来なかった患者は除外した。採血液を遠心分離し (1回目400xg, 20 min, 2回目10000xg x 5 min)、血小板数の少ない血漿を調製した。血漿は直ちに-80℃で凍結し、ELISA測定まで保存した。市販ELISAキット (R&D System, MN) を測定に用いた (IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, sE-selectin, sICAM)。

## 統計処理

年齢、ISS、乳酸値、pHについては、両群間の差はStudent's-t testで判定した。サイトカインレベルに対する経過時間の影響の検討には、反復測定ANOVAを用いた。経時的変化におけるベースラインと各測定時間との比較ではSheffe's testを用いた。2群間 (PolyHeme vs. PRBCs) の比較にはANOVAを用いた。IL-11レベルは検出限界以下になることがあるので、検定は行わなかった。全ての比較において、p値が0.05以下のとき有意な差と判断した。

## 結果

### 患者の一般状態

全体で25名の患者の結果を最終的に統計処理にかけた。このうち7名がPRBCs投与、残る18名がPolyHemeの投与を受けた。年齢、ISS、最初12時間の最低乳酸値、最低pH値に特に有意差はなし。PolyHeme群の患者は全て生存した。PRBCs群では2名 (29%) が晩期MOFにより死亡した。

### 炎症性サイトカイン (IL-8, IL-6)

PRBCs群では外傷後初期に増大した。IL-8は初期値 $27.4 \pm 10.3$  pg/mLから12時間後に最大値 $4323.1 \pm 2963.1$  pg/mLにまで、120倍増大した。IL-6は初期値 $348.8 \pm 180.1$  pg/mLから6時間後に最大値 $6489.5 \pm 3468.2$  pg/mLまで、約19倍増大した。一方、PolyHeme群では、経時的変化としては有意な上昇が見られたが、相対的な変化としてはIL-6が5倍、IL-8は12倍の増大に留まり、僅かであった。IL-6、IL-8ともにPRBCs群の方が有意に高い値を示した。

### 免疫調節性サイトカイン (IL-10, IL-11)

PRBCs群では、IL-10が $276.1 \pm 246.0$  pg/mLから3時間後に最大値 $552.4 \pm 184.2$  pg/mLに増大し、約2倍となった。PolyHeme群では、IL-10は初期値 $85.5 \pm 18.9$  pg/mLから3時間後に最大値 $180.2 \pm 74.3$  pg/mLに増大し、約2倍となった。両群とも有意な増大であった。初期値が両群で大きく異なるが、有意な差では無かった ( $p=0.20$ )。ANOVAでは、IL-10はPRBCs群がPolyHeme群に比較して有意に高い値となった。

IL-11は、検出限界以下となるが多かった。経時的に増大する傾向があり、初期値 $1.0$  pg/mLから48時間後に $11.4$  pg/mLにまで増大した。しかし、36、48時間以外の測定時間では全て検出不能であった。IL-11は僅かに測定できる程度であり、また被験者数も小さいので、検定はしなかった。

### 血管内皮障害マーカー (sICAM, sE-selectin)

従来結果と同様、sICAMとsE-selectinは徐々に有意な上昇を示した。sICAMの上昇はPRBCs群で僅かに高い値を示したが、有意な差ではなかった ( $p=0.10$ )。

## 論考

保存PRBCsが免疫炎症反応の副作用を起す可能性は、これまでもex vivo試験結果から指摘されている。我々の研究室で

も、PRBCsが外傷後にPMNを刺激し活性化させ、MOFを引起す可能性があることに注目してきた。特に、PolyHemeに比較してPRBCsを投与した患者のPMNsの活性化が非常に高いことをex vivo試験で見出した。赤血球の代わりにPolyHemeを投与することにより全身の炎症反応を弱めるという我々の仮説は、今回の追加試験におけるサイトカイン測定の結果と一致している。

炎症性サイトカインIL-8およびIL-6は、PolyHeme群で6~12時間後に僅かな増大がみられる。IL-8はケモカインの一種で、PMNsを刺激して活性化し、炎症領域への走化性を高める。外傷後の呼吸不全とMOF発症時にIL-8の急激な増大が見られる。更に、保存PRBCsの血漿がex vivoでPMNsからのIL-8産生を刺激することも確認した。PRBCs群で特にIL-8が高いことから、輸血が外傷後のIL-8産生量を増大させ、炎症性臓器障害に移行する危険性を増大させることが考えられる。しかし、IL-8の生理活性はIL-8濃度だけでなく、外傷後に変動する諸要素、例えばIL-8レセプターの活性なども含めて検討しなければならない。Adamsらによれば、 $Ca^{2+}$  Fluxから測定したIL-8に対するPMNsの応答は、外傷後1週間で大きく変化する。1日目は鈍い応答を示し、3日目に最大の応答を示す。従って正味のIL-8活性は、血漿中の濃度だけでは正確に示すことは出来ない。

IL-6は炎症性および抗炎症性サイトカインの両性質を有し、正確な役割は未だ解っていない。明らかなのは、IL-6の増大は、外傷または敗血症後の悪い結果の前兆となることである。IL-8と同様、PolyHeme群のIL-6微増は全身的な炎症反応の低下傾向を反映しているのであろう。

外傷に対する反応の一つに、炎症反応初期の刺激に対する免疫調節反応がある。この反応のメディエータとしてIL-10およびIL-11のサイトカインが推定されている。これらはPMNs、単球、リンパ球の活性を抑制する。一般的に、IL-10増大は予後不良の場合に見られる。しかしこれが危機的状態の指標なのか、IL-10の効果なのかは明らかではない。治療的にIL-10で免疫炎症反応を調節する方法は、様々な結果をもたらすが、対照的にIL-11では全身的な炎症反応の治療的調節剤として臨床試験が進められている。事故による外傷で見られた従来結果と同様、PRBCsで蘇生した患者にIL-10の増大が見られた。PolyHeme投与群では特に外傷後初期に、統計学的に有意に低いIL-10レベルを示した。従って、外傷初期の炎症反応が増大する時期に、PRBCsの代わりにPolyHemeを投与すると、免疫調節機能が鈍化したことを示唆する。IL-11は両群ともに増大する傾向があった。しかし濃度が極めて低く、恐らく生理的にも意味のあるレベルでは無いと考えられ、これ以上の議論は余り意味が無いと考えられた。

サイトカイン産生の様相はPRBCs群とPolyHeme群で異なり、また以前にex vivo試験でもEC活性が異なることが明らかになったが、今回ECの活性化/障害を反映するマーカー (sICAM/sE-selectin) には両群で有意な差は見られなかった。PRBCs群の被験者数が少ない事も原因の一つであるが、事実、大差は無いと判断すべきと思われる。サイトカインとPMNの

機能の測定から全身的な炎症反応の低下の証拠は得られたが、マーカーと内皮障害/活性化には変化が無い。

本研究ではデータ解釈に限界がある。まず第一に、初期値で両群に有意な差は見られないものの、PRBCs群の患者の方がより重度の障害と生理的な乱れがあること、また被験者数が少ないことである。第二に、PRBCs群の炎症反応の増大は、PRBCs保存中に産生された炎症惹起物質が、外傷後の炎症反応に対して火に油を注いだものと考えた。このことは、保存PRBCs中の血漿がPMNの機能に及ぼした我々の従来結果と一致している。他に考慮すべきことは、PMN機能評価ex vivo試験では明らかではなかったが、PolyHemeはin vivoで免疫調節機能を有することが考えられる。この場合、PRBCsの亢進作用というよりは、PolyHemeの抑制作用が両群間の差の原因とも考えられる。本研究の結果からは判断できないが、過去にPolyHemeの投与を受けた患者が、ex vivoでPMNの感作物質に対して正常な反応を示している。従ってPolyHemeの拮抗性効果よりも、PRBCsの作動性効果が有力である。第三に、解釈上、患者のサイトカインは内因性と仮定した。しかし、白血球除去に依らず血液製剤保存中に何らかのサイトカインの産生はある筈である。これは非溶血性輸血反応の機序の一つと考えられてきたが、このような反応を示す患者で見られたサイトカインレベル上昇を説明することが出来ない。それに、本研究の患者のサイトカイン上昇は、保存物に含まれるサイトカイン濃度(文献値)よりも著しく高い。従ってほとんどの場合、内因性サイトカインの測定値であったと考えるべきである。また、PRBCs由来であれ内因性であれ、患者のサイトカインレベルは十分に生理活性を示す量であると考えられる。

これまでに幾つもの興味ある研究が、外傷後投与したPRBCsが抑制不能な全身的炎症反応を亢進する可能性があることを指摘している。我々はPolyHemeの使用により、外傷後初期の段階でPRBCsの投与を回避した患者の炎症反応を比較検討することが出来た。PRBCsの代わりにPolyHemeを投与した患者の方が、炎症性および調節性サイトカインともに低レベルを示した。従って、外傷後MOFへ移行する可能性を低下させることになるであろう。

#### 訳者コメントの引用文献

[1] Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J,

Mallory MN, Rodman G Jr. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA*. 1999 17;282: 1857-64.

- [2] Bobofchak KM, Mito T, Texel SJ, Bellelli A, Nemoto M, Traystman RJ, Koehler RC, Brinigar WS, Fronticelli C. A recombinant polymeric hemoglobin with conformational, functional, and physiological characteristics of an in vivo O<sub>2</sub> transporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H549 - 561.
- [3] Edwards G, Levien L, Benn C. Oxygen therapeutic Hemopure in Breast Cancer Reconstructive Surgery. *人工血液* 2003;11:38
- [4] Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW, O'Hara PJ. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth Analg*. 2002;94:799-808.
- [5] Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, Parr GV, Stewart RW, Gratz I, Wahr J, Williams J, Comunale ME, Doblaz D, Silvay G, Cohen M, Jahr JS, Vlahakes GJ. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124:35-42
- [6] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, DeWoskin R, Moss GS. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergency surgery. *J Am Coll Surg* 1998; 187:113-122.
- [7] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, Hides GA, Freeman IH, DeWoskin R, Moss GS. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *J Am Coll Surg*. 2002;195:445-52.
- [8] Norris EJ, Ness PM, Williams GM. Use of a human polymerized hemoglobin solution as an adjunct to acute normovolemic hemodilution during complex abdominal aortic reconstruction. *J Clin Anesth*. 2003; 15: 220-3.